

GV2260 Chemically Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT#: AC2001)

GV2260 Competent Cell	100µl /支
pCAMBIA2301 (control vector, 10ng/µl)	10µl
保存条件 (保质期):	-80°C (12个月)

● 基因型

C58 (rif^R) Ti pGV2260 (pTiB6S3ΔT-DNA)(carb^R) Octopine

● 产品说明

GV2260 菌株为 C58 型背景, 核基因中含有筛选标签——利福平抗性基因 rif, 为了便于转化操作, 此菌株携带一无自身转运功能的脂碱型 Ti 质粒 pGV2260 (pTiB6S3ΔT-DNA), 此质粒含有 vir 毒性基因 (vir 基因是 T-DNA 插入植物基因组必需的元件)。pGV2260 (pTiB6S3ΔT-DNA)质粒 T-DNA 区的左右两侧的 T 被删除, 被来源于 pBR322 的序列取代, 含有筛选标签: carb, 赋予 GV2260 菌株羧苄青霉素抗性, 同时 GV2260 有弱的链霉素抗性。pGV2260 (pTiB6S3ΔT-DNA)Ti 质粒中无效序列及重复序列被删除, 具有更简洁、高效的 DNA 结构, 对部分单子叶植物如水稻、玉米和番茄、烟草等茄科植物侵染效率比其他农杆菌提高 20-50%, 适用于拟南芥、烟草、茄子、辣椒、番茄、土豆、斑茅等植物的瞬时表达和稳定遗传转化操作。唯地生产的 GV2260 化学转化感受态细胞经特殊工艺制作, pCAMBIA2301 质粒 (12739bp, Kan^R) 检测转化效率 >10⁴ cfu/µg DNA。

● 常规操作方法

1. 取-80°C保存的农杆菌感受态于室温或手心片刻待其部分融化, 处于冰水混合状态时插入冰中。
2. 每 100 µl 感受态加入 0.01-1 µg 质粒 DNA (转化效率较高, 第一次使用前最好做预实验确定所加质粒的量), 用手拨打管底混匀, 依次于冰上静置 5 分钟、液氮 5 分钟、37°C水浴 5 分钟、冰浴 5 分钟。
3. 加入 700 µl 无抗生素的 LB 或 YEB 液体培养基, 于 28°C振荡培养 2~3 小时。
4. 6000 rpm 离心一分钟收菌, 留取 100 µl 左右上清轻轻吹打重悬菌块涂布于含相应抗生素的 LB 或 YEB 平板上, 倒置放于 28°C培养箱培养 2-3 天。

(当平板只含有 50 µg/ml kan 时, 28°C培养 48 h 即可; 平板中同时加入 50 µg/ml kan, 20 µg/ml rif 时, 需 28°C培养 60 h; 如果使用的平板含有 50 µg/ml rif 则需要 28°C培养 72-90 h)。

农杆菌的利福平抗性来源于农杆菌的一个核基因突变, 不在 Ti 质粒上, 所以利福平与 Ti 质粒是否丢失没有关系, 利福平并不是农杆菌培养过程中必须要添加的抗生素; 相反, 在农杆菌培养基中加入利福平特别是加入利福平浓度过高会导致农杆菌生长变慢, 侵染活力降低, 在超净台中进行农杆菌实验可不添加利福平。

● 农杆菌相关抗生素配方:

抗生素	配方	原液	工作液
羧苄青霉素(carb)(唯地 CAT#: YC9040)	双蒸水溶解, 0.22 μm 滤膜过滤除菌	100 mg/ml	50 μg/ml
硫酸卡那霉素(kan)(唯地 CAT#YC9020)	双蒸水溶解, 0.22 μm 滤膜过滤除菌	100 mg/ml	50 μg/ml
壮观霉素(spec)(唯地 CAT#: YC9070)	双蒸水溶解, 0.22 μm 滤膜过滤除菌	100 mg/ml	75 μg/ml
链霉素(strep)(唯地 CAT#: YC9060)	双蒸水溶解, 0.22 μm 滤膜过滤除菌	100 mg/ml	50 μg/ml
利福平(rif)(唯地 CAT#: YC9080)	DMSO 溶解, 0.22 μm 滤膜过滤除菌	60 mg/ml	20 μg/ml
庆大霉素(gent)(唯地 CAT#: YC9090)	双蒸水溶解, 0.22 μm 滤膜过滤除菌	100 mg/ml	40 μg/ml
氯霉素 (cam) (唯地 CAT#: YC9030)	无水乙醇溶解, 0.22 μm 滤膜过滤除菌	100 mg/ml	68 ug/ml

● 常用农杆菌抗性: (R: 抗; R/-: 弱抗性; S: 敏感)

农杆菌菌株	羧苄青霉素 (carb)	链霉素 (strep)	利福平 (rif)	庆大霉素 (gent)	硫酸卡那霉素 (kan)
AGL-1	R	S	R	S	S
EHA101	S	S	R	S	R
EHA105	S	S	R	S	S
LBA4404	S	R	R	S	S
GV3101	S	S	R	R	S
GV2260	R	R/-	R	S	S

● LB (唯地 CAT#: CM1010) 及 YEB (唯地 CAT#: CM2010) 配方:

Component	LB(液体)/L	LB(固体)/L	component	YEB(液体)/L	YEB(固体)/L
Tryptone	10 g	10 g	Tryptone	5 g	5 g
Yeast extract	5 g	5 g	Yeast extract	1 g	1 g
NaCl	10 g	10 g	牛肉浸膏	5 g	5 g
NaOH	调 PH 到 7.0	调 PH 到 7.0	蔗糖	5 g	5 g
Agar	—	15 g	MgSO ₄ *7H ₂ O	0.49 g	0.49 g
			NaOH	调 PH 到 7.0	调 PH 到 7.0
			Agar	—	15 g

● 注意事项

1. 加入质粒时体积不应大于感受态体积的 1/10; 质粒不纯或存在乙醇等有机物污染, 转化效率急剧下降; 质粒增大一倍, 转化效率下降一个数量级; 混入质粒时应轻柔操作, 转化高浓度的质粒可相应减少最终用于涂板的菌量。
2. 平板上阳性克隆密度过大时, 由于营养不足, 阳性克隆生长变慢, 菌落变小, 为了获得大的菌落, 应减少质粒用量。
3. 利福平浓度不应高于 25 μg/ml, 过高的利福平浓度不利于农杆菌生长, 会降低其生长速度和转化效率。本公司 GV2260 感受态计算转化效率时所用平板只含有 50 μg/ml kan, 若所用平板含有 20 μg/ml rif 则转化效率降低到 1/2。
4. 培养基中加入利福平的目的是防止杂菌生长; 根据所用菌株抗性加入羧苄或庆大霉素可防止 Ti 质粒丢失, 但链霉素不利于农杆菌的转基因操作, 所以一般培养农杆菌时不考虑链霉素或庆大霉素, Ti 质粒丢失的概率极低 (可以忽略)。